

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：32305

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22817

研究課題名（和文）肥満の病態形成におけるBDNFの関与；脂肪組織内BDNFシグナル仮説の検証

研究課題名（英文）Involvement of BDNF in the pathogenesis of obesity; BDNF signaling hypothesis in adipose tissue

研究代表者

福地 守（Fukuchi, Mamoru）

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：40432108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：BDNFは、記憶学習などの高次脳機能発現に必須の分子である。一方で研究代表者は、BDNFが脂肪組織にも発現しており、体重増加に伴って脂肪組織におけるBDNF発現も増加することを偶然発見した。そこで本研究では、高脂肪食給餌肥満モデルマウスを用いて、脂肪組織に高発現するBDNFに着目して解析を行った。その結果、BDNFは、高脂肪食給餌後、早い段階から皮下脂肪および内臓脂肪において発現が増加し、この発現増加にはマクロファージが関わる可能性を新たに発見した。各種遺伝子発現変化とBDNF発現誘導を照らし合わせた結果、皮下脂肪ではBDNFは善玉的に、内臓脂肪では逆に悪玉的に作用する可能性が予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BDNFは、高次脳機能発現に根幹的に重要な分子であり、うつ病やアルツハイマー病などの脳神経系の疾患のバイオマーカー、さらには創薬ターゲットとなることが期待されている。しかし本研究は、BDNFが末梢の組織である脂肪組織に発現しており、肥満の病態形成に関与する可能性に着目した萌芽的なものである。さらに、本研究の結果により、BDNFが皮下脂肪と内臓脂肪で異なる役割を果たす可能性が予想された。これは、肥満の病態形成や進行の分子機構の理解、さらには病的な肥満状態の改善法の開発研究において、新たな知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：BDNF is an important molecule for the expression of higher brain functions such as memory learning. However, we discovered by chance that BDNF is also expressed in adipose tissue, and that BDNF expression in adipose tissue also increases with weight gain. Therefore, in this study, we focused our analysis on BDNF, which is highly expressed in adipose tissue, using a mouse model of obesity fed a high-fat diet. We found that BDNF expression increased in subcutaneous and visceral fat early after feeding a high-fat diet, and that macrophages may be involved in this increase. The results of comparing the various gene expression changes with the induction of BDNF expression predicted that BDNF may act in a beneficial manner in subcutaneous fat and conversely in a deleterious manner in visceral fat.

研究分野：分子神経科学

キーワード：BDNF 肥満モデルマウス 皮下脂肪 内臓脂肪 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子 (BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor) は、神経経路形成因子として同定された神経栄養因子ファミリーに属する分泌性のタンパク質である。これまでの研究により、BDNF は、神経細胞の生存や分化、シナプスの構造や機能の調節、神経ネットワークの形成、さらには記憶学習などの高次脳機能の発現において根幹的に重要な分子であることが明らかとなっている。

これまでに我々は、脳・神経系における BDNF の発現制御メカニズムの解明を目指して研究を進めてきた。この研究の過程で、ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼを利用して BDNF の発現変化を生物発光により計測・可視化可能なトランスジェニックマウス「BDNF-Luc マウス」を作成し (Fukuchi *et al.*, *J Neurosci* (2015))、生体マウスで BDNF 発現変化を可視化することに成功した (Fukuchi *et al.*, *Sci Rep* (2017))。BDNF-Luc マウスを用いた当初の目的は、脳における BDNF 発現を生理的条件下あるいは病理生理的条件下で発光により可視化することであったが、この解析の中で我々は、発光がマウスの腹部においても検出されることを見出した。興味深いことに、この腹部の発光は体重の増加に伴い上昇し、高脂肪食を与えた BDNF-Luc マウスでは体重増加と相関して腹部の発光が顕著に増加した。この発光の増加と一致して、高脂肪食を与えたマウスの脂肪組織では、内在性 BDNF mRNA の発現が亢進していた。したがって、脂肪組織に高発現した BDNF は、肥満の病態形成や進行に関連する可能性が考えられた (Fukuchi *et al.*, *Sci Rep* (2017))。

すでに BDNF と肥満との関連性は指摘されているが、これは、摂食やエネルギー代謝の調節に関与する視床下部、すなわち中枢神経系における BDNF の機能に基づいたものである。一方、脂肪組織などの末梢組織に発現する BDNF の役割については、不明な点も多く残されており、脂肪組織において発現が増加した BDNF と肥満の病態との関連性は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪組織において発現が増加した BDNF が、肥満の病態形成や進行に関与する可能性に着目した。これまでに、病的な肥満の脂肪組織は (1) 慢性炎症・低酸素状態である、(2) 炎症に関わる M1 型マクロファージが増加する、(3) 血管新生が亢進する、等の報告がある。脂肪組織内における血管新生の亢進は、新たな組織への栄養等の過供給を招き、脂肪組織の肥大化に関わる。一方、(4) BDNF は脂肪組織に発現が認められるが脂肪細胞には発現していない、(5) BDNF はマクロファージ (M1 型および M2 型ともに) に発現している、(6) BDNF は低酸素誘導因子 (HIF1 α) を介して血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 発現を誘導する、等の報告もある。

BDNF-Luc マウスを用いた脂肪組織における BDNF 発現の新たな知見および上記 (1) ~ (6) の報告より、高脂肪食等の肥満の危険因子は、マクロファージにおける BDNF 発現を増加させ、発現した BDNF は脂肪組織内の低酸素状態により誘導された HIF1 α を介して VEGF 発現を活性化し、血管新生を亢進させることにより脂肪組織の肥大化、そして病的な肥満の病態形成や進行に関与するのではないかと仮説を立てた。この仮説を「脂肪組織内 BDNF シグナル仮説」とし、本研究ではこの仮説を検証することで、肥満の病態形成・進行につながる脂肪組織内の新規イベントを明示するとともに、脂肪組織内の BDNF シグナルを標的とした独創的な新規肥満治療戦略の構築のための知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、高脂肪食給餌肥満モデルマウスを用いて、脂肪組織中の BDNF 発現の時空間的な変化を解析するため、BDNF-Luc マウスに高脂肪食を給餌し、腹部周辺の発光変化を生体発光イメージングにより解析することで、BDNF 発現が増加する時期および部位の特定を行った。得られた解析結果に基づき、BDNF 発現が増加する初期および後期の時期に着目し、脂肪組織中のマクロファージ、血管新生、炎症等の肥満の病態に関連するイベントのマーカ分子の発現変化を解析し、BDNF 発現との相関性を検討した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食給餌後の BDNF 発現の経時的変化 (図 1)

BDNF-Luc マウスに通常食を与え、体重および腹部周辺の発光を毎日測定したが、実験開始初日と比較して顕著な変化は認められなかった。一方、通常食から高脂肪食に変更して同様に解

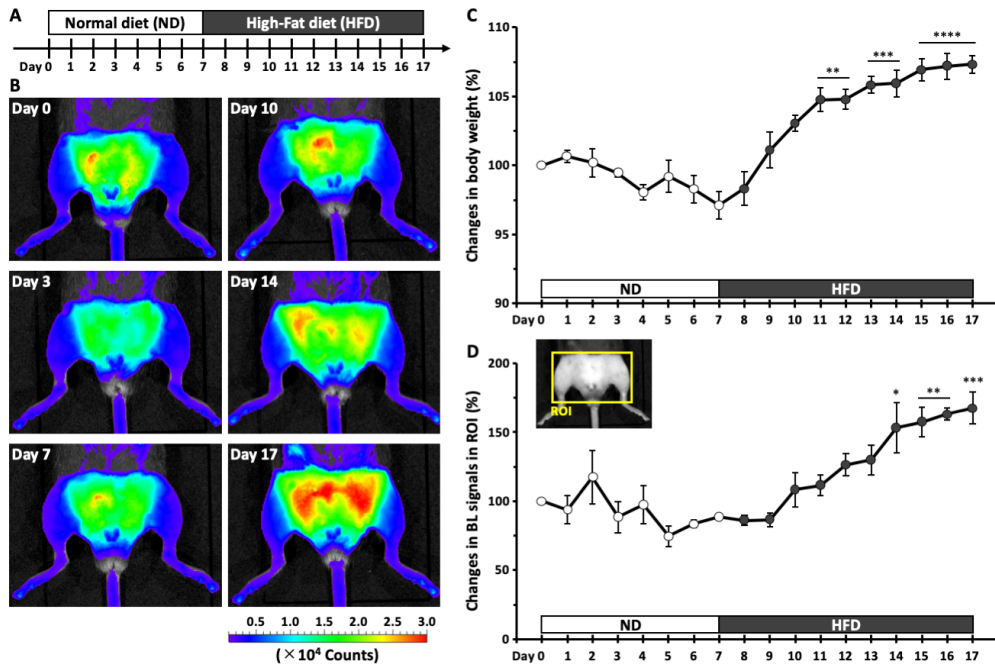


図1 NDまたはHFD給餌後のBDNF-Lucマウスの体重および腹部の発光変化
 A: 実験スケジュール. B: 発光イメージングの結果例. C: 体重変化. D: ROI部分の発光強度の変化.

析を行ったところ、4日後より体重は有意に増加し、また7日後からは腹部の発光強度も有意に増加した。以前の解析 (Fukuchi *et al.*, *Sci Rep* (2017)) において、高体重のマウスの脂肪組織では BDNF mRNA 発現が増加することが明らかとなっているが、体重増加に伴う脂肪組織内 BDNF mRNA 発現誘導は、7日後以降という早期の段階から生じていることが示唆された。

(2) 高脂肪食給餌2週間後の各種組織における BDNF mRNA 発現変化 (図2)

次に、野生型マウス (C57BL/6N、雄性、8週齢) に通常食または高脂肪食を給餌し、2週間後に海馬、鼠径部白色脂肪組織 (IWAT)、精巣上体白色脂肪組織 (EWAT)、褐色脂肪組織 (BAT)、および肝臓を単離し、BDNF mRNA 発現変化を解析した。その結果、高脂肪食を2週間給餌し

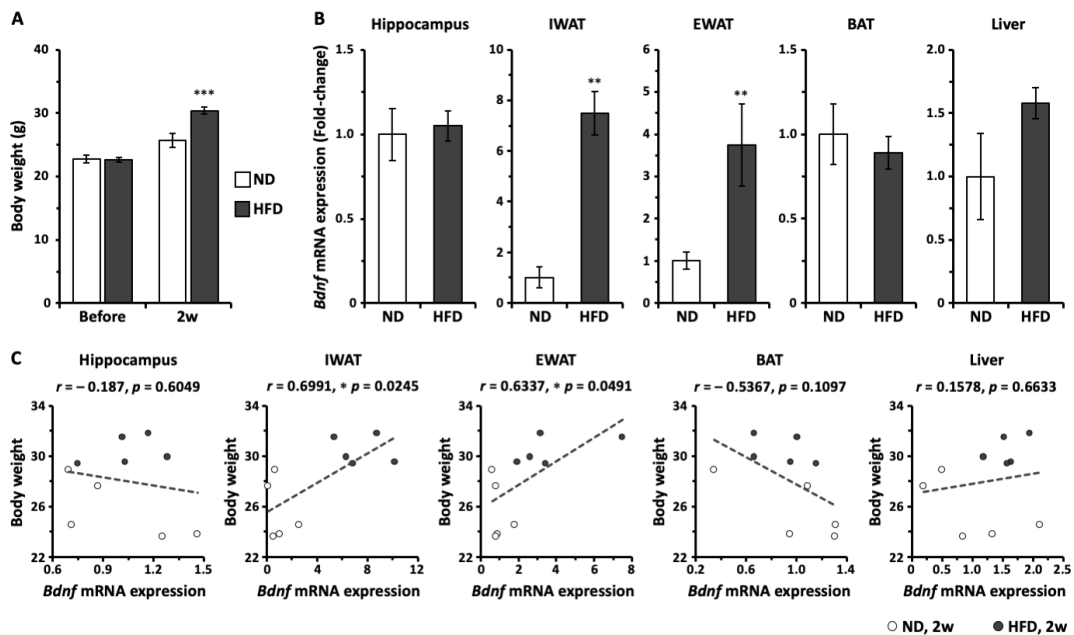


図2 高脂肪食給餌2週間後の体重および各種組織におけるBDNF mRNA発現変化
 A: 体重変化. B: 海馬、鼠径部白色脂肪組織 IWAT、精巣上体白色脂肪組織 EWAT、褐色脂肪組織 BAT、肝臓におけるBDNF mRNA発現変化. C: 体重変化とBDNF mRNA発現変化との相関性.

たマウスの IWAT および EWAT において、BDNF mRNA 発現が有意に増加した。さらに、体重及び BDNF mRNA 発現の相関性を解析した結果、IWAT および EWAT では、体重増加と BDNF mRNA 発現レベルが有意に正相関することが明らかとなった。

(3) 高脂肪食給餌 2 週間後の IWAT および EWAT におけるマクロファージマーカー発現変化 (図 3)

高脂肪食給餌 2 週間後の IWAT および EWAT においては、マクロファージマーカーである F4/80 発現が有意に増加した。この増加は、BDNF mRNA 発現増加と相関して認められることが明らかとなった。マクロファージは、炎症や組織傷害と関連する M1 マクロファージ、および抗炎症や組織

Correlation (IWAT, 2w)				Correlation (EWAT, 2w)				
		r	p		r	p		
M1	BDNF vs F4/80	0.7844	0.0072	**	BDNF vs F4/80	0.8056	0.0049	**
	BDNF vs TNF α	0.5213	0.1223	NS	BDNF vs TNF α	0.3747	0.2861	NS
	BDNF vs MCP-1	0.5633	0.09	NS	BDNF vs MCP-1	0.7191	0.7191	*
	BDNF vs CD11c	0.5555	0.0955	NS	BDNF vs CD11c	0.2702	0.4503	NS
	BDNF vs CD68	0.5858	0.0751	NS	BDNF vs CD68	0.4633	0.1775	NS
M2	BDNF vs CD163	0.8006	0.0054	**	BDNF vs CD163	0.5106	0.1316	NS
	BDNF vs TGF β	0.6985	0.0246	*	BDNF vs TGF β	0.52	0.1234	NS
	BDNF vs IL-10	0.5622	0.0908	NS	BDNF vs IL-10	0.1458	0.6878	NS
	BDNF vs CD209a	0.7735	0.0087	**	BDNF vs CD209a	0.7954	0.0059	**

図3 高脂肪食給餌 2 週間後の IWAT および EWAT における BDNF mRNA とアディポネクチン、マクロファージマーカー発現変化

修復と関連する M2 マクロファージに大別されるため、M1 および M2 マクロファージマーカー発現も同様に解析した。その結果、IWAT では、M2 マクロファージマーカーである CD163 発現の有意な増加が認められた。さらに、全体的な傾向として、高脂肪食給餌 2 週間後の IWAT においては、BDNF mRNA 発現と M2 マクロファージマーカー発現が統計学的に有意に相関していることが示唆された。一方、EWAT ではこのような特徴は認められなかった。さらに、IWAT においては、インスリン抵抗性の改善作用などを有する善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの発現も増加しており、BDNF mRNA 発現との相関性も認められた。IWAT は皮下脂肪であり、余分なエネルギー貯蔵などの役割を果たしている。今回の結果を考慮すると、高脂肪食給餌 2 週間後の IWAT では、抗炎症・組織修復に関連する M2 マクロファージ、その他アディポネクチンの発現が BDNF 発現と相関して増加したことから、BDNF は IWAT において肥満の病態形成に対して抑制的な作用を有する可能性が考えられた。

なお、高脂肪食給餌 8 週間後の場合、IWAT および EWAT において BDNF 発現はより顕著に増加した。高脂肪食給餌 8 週間後では、IWAT、EWAT ともに M1 および M2 マクロファージが著増しており、BDNF 発現との相関性も認められた (図 4) ため、BDNF は肥満の病態形成に

Correlation (IWAT, 8w)				Correlation (EWAT, 8w)				
		r	p		r	p		
M1	BDNF vs F4/80	0.9274	0.0003	***	BDNF vs F4/80	0.9855	< 0.0001	****
	BDNF vs TNF α	-0.5585	0.1181	NS	BDNF vs TNF α	0.9786	< 0.0001	****
	BDNF vs MCP-1	0.9527	< 0.0001	****	BDNF vs MCP-1	0.9886	< 0.0001	****
	BDNF vs CD11c	0.8527	0.0035	**	BDNF vs CD11c	0.9693	< 0.0001	****
	BDNF vs CD68	0.8062	0.0087	**	BDNF vs CD68	0.9857	< 0.0001	****
M2	BDNF vs CD163	0.9768	< 0.0001	****	BDNF vs CD163	0.9304	0.0003	***
	BDNF vs TGF β	0.8326	0.0053	**	BDNF vs TGF β	0.9811	< 0.0001	****
	BDNF vs IL-10	0.7571	0.0182	*	BDNF vs IL-10	0.9898	< 0.0001	****
	BDNF vs CD209a	0.6311	0.0684	NS	BDNF vs CD209a	0.9776	< 0.0001	****

図4 高脂肪食給餌 8 週間後の IWAT および EWAT における BDNF mRNA とアディポネクチン、マクロファージマーカー発現変化

に対して促進的に働くことが予想された。特に EWAT での BDNF 発現増加は顕著であり、EWAT はインスリン抵抗性や耐糖能異常などの病的な肥満の形成に関わる内臓脂肪であることから、EWAT では発現が増加した BDNF により肥満の病態が促進する可能性が考えられた。

(4) BDNF を発現する脂肪組織中の細胞種の同定

Conditional BDNF-KO マウスを用いた報告より、BDNF は脂肪組織に発現しているものの、脂肪細胞には発現していないことが示されている。この結果を支持するように、脂肪細胞に分化誘導させることが可能な 3T3-L1 細胞を用いた解析の結果、脂肪細胞への分化誘導に伴い速やかに BDNF mRNA 発現が減少した。一方、上記(3)の結果から、脂肪組織における BDNF mRNA 発現はマクロファージマーカー発現と相関して増加することが明らかとなった。BDNF mRNA は、選択的プロモーターおよび選択的スプライシングにより複数種類の mRNA が産生されるが、脂肪組織に発現している BDNF mRNA の種類は、マクロファージ細胞株に発現している BDNF mRNA の種類と酷似していた。これらの結果より、脂肪組織において BDNF を発現している細胞は、マクロファージである可能性が考えられた。そこで、マクロファージ除去剤であるクロドロン酸内包リポソームを高脂肪食給餌肥満モデルマウスに投与して解析を行った。クロドロン酸内包リポソーム投与により、IWAT 中のマクロファージマーカー発現は 30%程度にまで減少した。この条件下では、高脂肪食給餌による BDNF mRNA 発現誘導が認められなくなった。また、同様の傾向は EWAT でも認められた。したがって、高脂肪食給餌 2 週間後に認められた BDNF mRNA 発現誘導には、マクロファージが少なくとも一部は関与することが示唆された。また、通常食を給餌したマウスにおいても、クロドロン酸内包リポソームを投与すると、IWAT 中のマクロファージマーカー発現は 30%程度にまで減少したが、BDNF mRNA 発現には影響がなかった。したがって、通常の状態での IWAT における BDNF 発現にはマクロファージは関与せず、高脂肪食給餌時に生じる BDNF mRNA 発現誘導においてのみマクロファージが関わる可

能性が考えられた。

(5) 高脂肪食給餌後の白色脂肪組織における BDNF および血管新生関連因子発現の相関性

研究計画立案当初の目的の1つとして、BDNFによるHIF1 α を介したVEGF発現誘導に関する研究があった。そこで、高脂肪食給餌後のIWATおよびEWATにおけるHIF1 α および血管新生関連因子(VEGFおよびPDGF)の発現変化、およびBDNF発現変化との相関性を解析した。その結果、IWATおよびEWATどちらにおいても、BDNF発現とHIF1 α 発現は有意に正に相関していた。また、IWATにおいてはBDNFとVEGF、BDNFとPDGF、HIF1 α とVEGF、そしてHIF1 α とPDGFが正に相関していたことから、BDNF発現増加がHIF1 α 発現を誘導し、VEGFやPDGFの発現を制御している可能性が考えられた。一方、EWATではBDNFとPDGF、HIF1 α とPDGFが正に相関していたが、BDNFとVEGF、HIF1 α とVEGFには統計学的に有意な相関性は認められなかった。これらのことから、以前の研究により脂肪組織では血管新生による栄養の過供給が肥満の形成に関わることが知られているが、血管新生関連因子としては、IWATではVEGFおよびPDGFが、EWATではPDGFが主に関与しており、本研究における一連の相関性に関する解析から、これらの血管新生関連因子の発現には、BDNF-HIF1 α を介した発現制御系が関与することが示唆された。

(6) 結論

高脂肪食給餌肥満モデルマウスを用いた本研究の結果、白色脂肪組織におけるBDNF発現は、肥満形成の早期段階より認められることが明らかとなった。また、この早期に認められたBDNF発現誘導は、IWATでは肥満の病態形成に対して抑制的に働く可能性が考えられた。さらに、このBDNF発現誘導には、少なくとも一部はマクロファージが関与することが示唆された。一方、EWATにおいては、病的な肥満の進行に伴いBDNF発現誘導もより高く生じたことから、EWATでは、BDNFが肥満の病態形成に対して促進的に作用する可能性が予想された。したがって、特に内臓脂肪においては、BDNFは肥満の病態形成の促進因子であり、BDNFおよびその下流のシグナル伝達経路の抑制因子は、肥満の病態に対して抑制的に働き、治療薬開発のためのターゲット分子となることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuchi Mamoru, Saito Ryohei, Maki Shojiro, Hagiwara Nami, Nakajima Yumena, Mitazaki Satoru, Izumi Hironori, Mori Hisashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Visualization of activity-regulated BDNF expression in the living mouse brain using non-invasive near-infrared bioluminescence imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00665-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuchi Mamoru, Mitazaki Satoru, Saito-Moriya Ryohei, Kitada Nobuo, Maki Shojiro A, Izumi Hironori, Mori Hisashi	4. 巻 172
2. 論文標題 Bioluminescence imaging using D-luciferin and its analogs for visualizing Bdnf expression in living mice; different patterns of bioluminescence signals using distinct luciferase substrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 321 ~ 327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三反崎聖, 若林千央, 福地守
2. 発表標題 卵巣摘出マウスにおけるBDNF発現の減少と自発運動量の変化の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田くるみ, 小林武寛, 三反崎聖, 福地守
2. 発表標題 脂肪食給餌肥満モデルマウスの白色脂肪組織におけるBDNF遺伝子発現誘導
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三反崎聖, 福地守, 阿部すみ子
2. 発表標題 卵巣摘出モデルにおける自発運動量低下とBDNFの変化
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三反崎聖, 阿部すみ子, 福地守
2. 発表標題 卵巣摘出マウス卵巣周囲白色脂肪組織に着目したBDNFと肥満の関わり
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横倉 早紀, 三反崎 聖, 福地 守
2. 発表標題 脂肪組織におけるBDNF遺伝子発現は肥満により増加する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福地守, 三反崎聖, 森屋亮平, 北田昇雄, 牧昌次郎, 和泉宏謙, 森寿
2. 発表標題 Bdnf-Luciferaseトランスジェニックマウスを用いたin vivo発光イメージングにおけるD-ルシフェリンおよびその類似化合物の比較
3. 学会等名 NEURO2022 第45回日本神経科学大会 第65回日本神経化学学会大会 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田くるみ, 小林武寛, 横倉 早紀, 三反崎聖, 福地守
2. 発表標題 高脂肪食給後のマウス白色脂肪組織におけるBDNF発現誘導; 内臓脂肪および皮下脂肪においてBDNFが異なる役割を果たす可能性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高崎健康福祉大学薬学部分子神経科学研究室 (福地研) https://www.facebook.com/pg/UHWMoINeurosci/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------